

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08908

研究課題名（和文）病理検索・術前診断用マーカー開発を起点とする肺腺癌STAS発生の癌微小環境の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the cancer microenvironment for the development of STAS in lung adenocarcinoma as a fundamental of the development of markers for pathological search and preoperative diagnosis

研究代表者

矢追 毅 (Yaoi, Takeshi)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40311914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：近年、肺がん細胞が主腫瘍から細気管支に広がる現象（STAS）が発見され、肺腺癌の予後不良に關与することが分かりましたが、この細胞の発生や移動の仕組みは未解明のままです。本研究では肺がん組織内の特定タンパク質の分布や遺伝子活性化状態を分析し、STAS細胞が腫瘍内部から周辺部へ移動するモデルを提唱しました。今後これをもとに、STASの仕組みや肺がんの進行に対する影響を更に深く理解することを目指します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、非小細胞肺がんの標準治療は「肺葉切除術」と呼ばれる大規模な手術でしたが、最近では早期の肺腺癌に対して「区域切除術」という、より小規模な手術が広がっています。この手術は肺の機能をより多く残し、患者の生活の質（QOL）を向上させると期待されています。しかし、区域切除は再発率が高いとの報告もあります。私たちの研究は、区域切除の際の再発の重要な要因の一つとなる「STAS」という腫瘍細胞の特徴を解明し、再発を防いだり再発後の適切な治療法の確立のための基盤となるものです。

研究成果の概要（英文）：In recent years, scientists have discovered that cancer cells can spread from the main tumor into the small air sacs in the lungs, a process called STAS. This spreading is linked to worse outcomes in lung adenocarcinoma, a common type of lung cancer. However, we still don't fully understand how these cells move and develop. Our research aimed to learn more about this process by studying lung cancer tissue with special stains and genetic tests. From our findings, we suggested that STAS cells might come from deep within the tumor and move out to its edges. These cells might keep traits from the tumor's edge, showing the variety within the tumor itself. Our study aims to improve understanding of how this spreading happens and its impact on lung cancer progression.

研究分野：分子病理学

キーワード：肺腺癌 非小細胞肺癌 STAS 空間トランスクリプトミクス 細胞系譜 CD44 腫瘍不均一性

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界のがん関連死亡の主要な原因であり、中でも非小細胞肺癌（特に肺腺癌）が大部分を占める。肺腺癌の転移様式は血行性転移、リンパ行性転移、直接浸潤など多様である。近年、新たな浸潤様式として、主腫瘍周囲の肺腔内へ腫瘍細胞が広がる経気腔進展（spread through air spaces: STAS）が注目されている。STASは肺腺癌術後の独立した予後不良因子とされ、その形態は single cell STAS、micropapillary cluster STAS、solid nest STAS の3つに分類される。

長らく非小細胞肺癌の標準治療は「肺葉切除術+縦隔郭清」であった。最近の第Ⅲ相大規模試験[1]では、早期肺癌患者における区域切除術と肺葉切除術の全生存期間が比較された。区域切除は肺葉切除と同等以上の根治性を示したが、より高い局所再発率が確認された。根治的肺機能温存術式として普及してきた区域切除において、局所再発の回避は喫緊の課題である。STASが発生すると、肺葉切除よりも区域切除において局所再発率が高くなることが示されている[2]。したがって、区域切除の際の再発の重要な要因である STAS の病理や予後不良の原因を解明することは、再発防止および再発後の適切な治療法確立に不可欠である。

しかしながら、STAS の発生・進展や癌微小環境の分子基盤については未だ不明である。これらの解明は、組織を構成する細胞群の詳細な病理学的特徴を理解する手がかりとなる。私たちは既に、組織レベルでの遺伝子発現について以下の知見を得ている：①STAS 腫瘍における上皮間葉系転換（EMT）関連遺伝子群の発現は総体的に上皮型に偏る、②STAS 特異的あるいは微小乳頭パターン出現割合と相関する変動遺伝子群、③mRNA の安定性や翻訳効率に影響する poly(A)配列付加部位の変動遺伝子群およびその制御遺伝子の発現変動。これらの知見は、STAS の発生・進展に関わる細胞群の状態や性質の遷移を理解する上で重要な分子基盤を示している。これらの特徴分子は、病理学的検査のみならず、適切な治療法選択と予後予測を目的とする診断への応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺腺癌における STAS の発生・進展と予後不良の原因となる分子機構を解明することにある。特に、STAS が癌微小環境変化への適応過程である可能性を考慮し、STAS および癌免疫微小環境を構成する細胞群の遺伝子発現が病態進展に伴いどのように遷移するかを解析する。その結果として、STAS 特異的分子マーカーとなり得る病理的基盤となる分子群を探索する。

3. 研究の方法

① STAS 陽性/陰性の肺腺癌腫瘍組織及び隣接する非腫瘍肺組織の RNA-seq を行い、STAS 特異的な発現変動遺伝子や選択的スプライシングの差のある遺伝子の検出には TCC-baySEQ および MAJIQ/Voila を用いた。RNA 抽出は RNeasy tissue kit を使用し、ライブラリ調製は Illumina 社の標準プロトコールに従った。データのクオリティコントロールには FastQC を使用し、トリミングとフィルタリングは Trim Galore を用いて行った。リードのマッピングには STAR を、リードカウントには RSEM を使用した。

② 当院で外科的切除を行った原発性肺腺癌（pStageI）14 例由来 FFPE 切片を対象に、STAS 腫瘍細胞や原発巣腫瘍領域の細胞における蛋白発現を、同一標本多重免疫組織化学により解析した。マイクロウェーブ（MW）処理による抗原不活化とブロッキング反応ののち「1次・2次の各抗体反応と洗浄→発色→ホールスライドイメージング→酵素失活・脱色」を同一標本に対して抗原毎に繰り返した。なお、本研究では MW を用いてブロッキング反応を 1 分間、各抗体反応を 10 分と迅速化する同一標本迅速多重免疫組織化学法を新たに開発し使用した。スライドのデジタルイメージングには、浜松フォトニクス製 NanoZoomer S60 バーチャルスライドスキャナおよび NDP.view2 ソフトウェアを用いた。

③ STAS 陽性/陰性肺腺癌腫瘍組織 FFPE 切片から Visium CytAssist (10x Genomics 社) を用いた空間 transcriptome データを、大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室に委託し取得した。空間 transcriptome データの in silico 解析では、シーケンスデータの前処理に Space Ranger ソフトウェア (10x Genomics 社) と Gitto パッケージを用い、クラスター解析、特徴遺伝子群の抽出にも Gitto を用いた。結果の視覚化には Loupe Browser (10x Genomics 社) と Gitto を使用し、主要な発現パターンと遺伝子セットの同定を行った。組織切片全体を対象とする細胞系譜解析には stLearn を使用した。さらに、Monocle3 パッケージを用いて STAS 腫瘍細胞を対象とする軌道解析を行った。

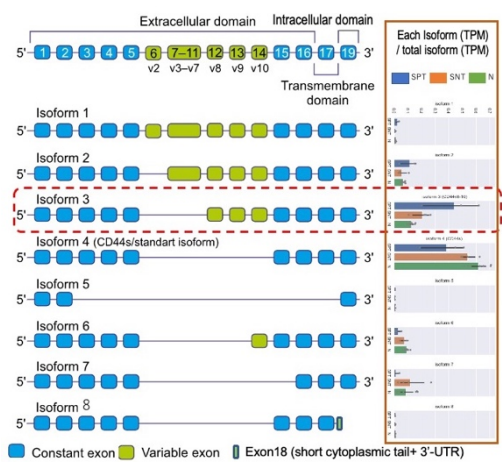
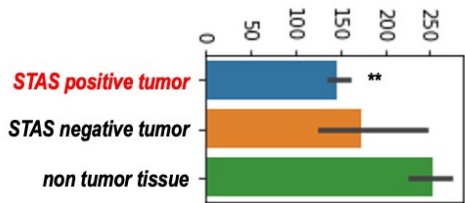
④ 各 spot の正規化したカウントデータを対数変換し、Visium の各 spot 内の細胞集団の平均的な上皮性 (E) や間葉性 (M) 状態の度合いを示す E スコアと M スコアを算出した。スコアリングは R パッケージの GSVA [3] を用いた。各 spot (1 発現データポイント) について、上皮性 (288 遺伝子) と間葉性 (188 遺伝子) の遺伝子リストを用いて 2 つのスコアを計算した [4]。GSVA は

全サンプルを用いて各遺伝子の累積密度関数を推定し、サンプル間で遺伝子をランク付けし、Kolmogorov-Smirnov ランダムウォーク統計量を用いて各遺伝子セットについて-1 から 1 の間のスコアを計算する。2つのスコアの差を計算し、上皮間葉転換 (EMT) スコアとして用いた。EMT スコアがプラス (高い) の spot は間葉性が優勢で、EMT スコアがマイナス (低い) の spot は上皮性優勢である。結果の可視化には Python および Python ライブラリ (Pandas, Matplotlib, Seaborn) を使用した。更に、③で Monocle3 による解析で得た軌道上の STAS 腫瘍細胞の各 spot 上に EMT スコアをヒートマップとして可視化した。

4. 研究成果

(1) CD44 における STAS 特異的選択的スプライシング

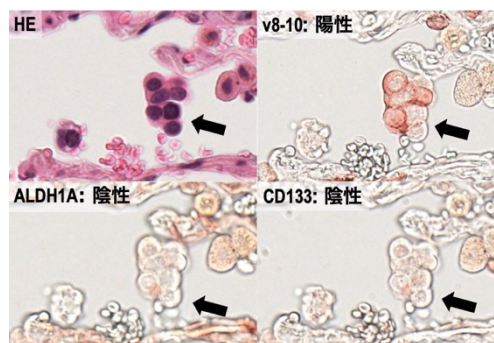
原発巣腫瘍組織のバルク RNA-seq 解析の結果、上皮細胞特異的 RNA 結合タンパク質 ESRP1 mRNA の STAS 陽性腫瘍特異的な発現亢進を見出した(右上図)。ESRP1 は標的遺伝子 CD44 の pre-mRNA に結合し、上皮細胞特異的エクソン(v8, v9, v10)の取り込みを亢進することが知られている。同じ RNA-seq データから、STAS 陽性腫瘍特異的に panCD44 の mRNA 発現が低下していた。一方、選択的スプライシングによる isoform の発現解析を行ったところ、STAS 陽性腫瘍における CD44 の主要な isoform が CD44 v8-10 であることがわかった(右中図; 赤枠)。CD44 v8-10 は CD44 の上皮細胞特異的 isoform である。背景で述べたように、STAS 腫瘍における上皮間葉系転換 (EMT) 関連遺伝子群の発現は総体的に上皮型に偏っていることを示す知見をすでに我々は得ていた。ESRP1 や CD44 v8-10 の発現パターンは、遺伝子発現制御のみならず選択的スプライシング制御の階層でも総体的に上皮型に偏っている可能性を示唆した。



(2) STAS 腫瘍細胞塊は癌幹細胞を含まない

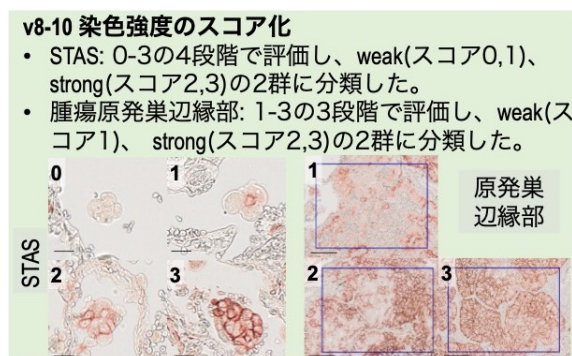
CD44 v8-10 (以下、v8-10 と表記) は、肺腺癌における高発現が予後不良因子であること、多くの臓器由来固形癌において癌幹細胞マーカー分子となりうる事が報告されている。このことから、STAS の再発予後不良因子の原因として、薬剤抵抗性などの性質を有する癌幹細胞が STAS 腫瘍細胞塊に含まれ主腫瘍から進展しているのではないかと予想した。

そこで、micropapillary cluster 型 /solid nest 型 STAS 腫瘍細胞塊を対象に、同一標本多重免疫組織化学による癌幹細胞 (v8-10/ALDH1A/CD133 トリプル陽性) の検出を試みた。しかし、いずれの型の STAS も v8-10 シングル陽性細胞のみから構成されており(右下図; 矢印が STAS 細胞塊)癌幹細胞は検出されなかったことから、この仮説は否定された。



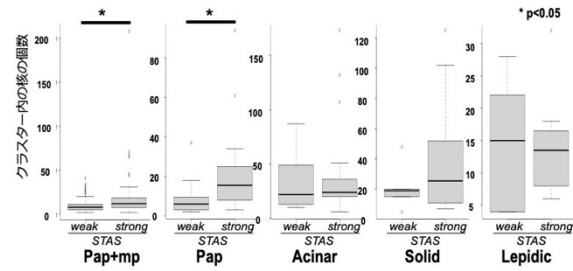
(3) STAS 腫瘍細胞と腫瘍原発巣辺縁部における腫瘍細胞間不均一性

上述の同一標本多重免疫組織化学のデータを観察するなかで、STAS や原発巣の腫瘍細胞における v8-10 の染色強度に不均一性が存在することに気付いた。そこで、この不均一性に何らかの特徴があるかどうか明らかにするために、v8-10 染色強度をスコア化し (左図)、STAS 腫瘍細胞間、原発巣腫瘍細胞間そして STAS-原発巣腫瘍細胞間でのスコア値の比較を、主腫瘍局所の組織亜型ごとに分けて行った。

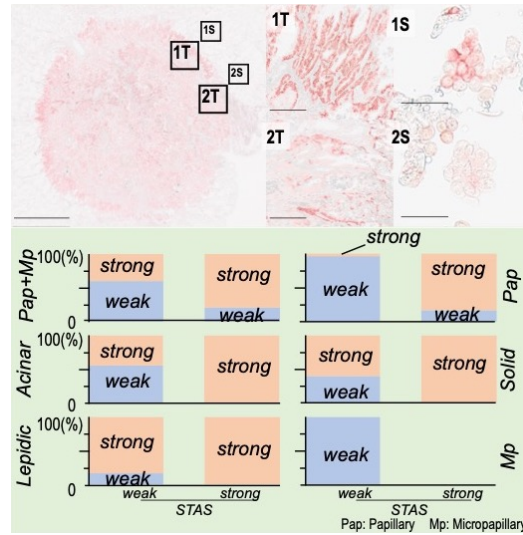


まず、バルク RNA-seq 解析結果から STAS 陽性腫瘍塊の上皮性-間葉性状態の度合いは総体的に上皮型に偏ること、v8-10 は CD44 の上皮型 isoform であること、STAS 細胞塊が腫瘍細胞の転移様式であることから、低スコア細胞は EMT により原発巣辺縁部から抜け出

したばかりの細胞であり時間と共に上皮性に転換する、すなわち辺縁部からより離れた STAS ほど高スコア示すことが考えられた。そこで、STAS 細胞塊とその最近傍原発巣辺縁部腫瘍細胞までの距離と STAS のスコア値を比較したが統計的有意な関係は認められなかった。次に、STAS 腫瘍細胞塊内の細胞数とスコア値を比較した。最近傍原発巣辺縁部が papillary/micropapillary あるいは papillary の場合、スコア値が高いと STAS 腫瘍細胞塊内の細胞数が多いことが判明した (右上図)。興味深いことに原発巣辺縁部の組織亜型がいずれの場合においても、STAS 腫瘍細胞と最近傍の腫瘍原発巣辺縁部との間には v8-10 染色強度に強い類似性が存在した (右下図)。



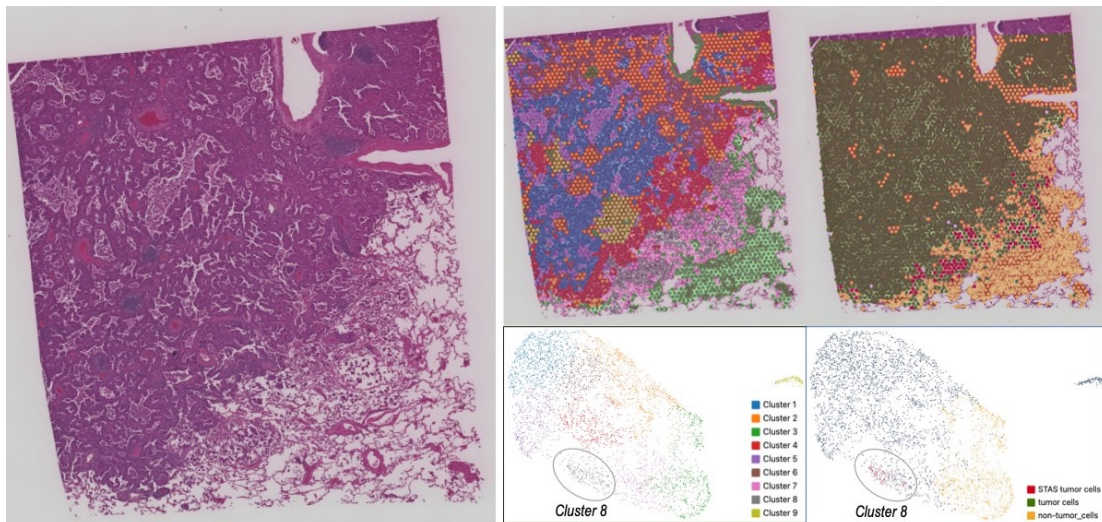
ところで、v8-10 はグルタミン酸-シスチントランスポーター (xCT) との相互作用により xCT を安定化する。この作用を通じて、細胞内の主要な抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) の合成を促進することにより、活性酸素防御に寄与することが報告されている。そこで、腫瘍細胞では酸化ストレスにより DNA 損傷 (8-oxo-dG 化) が起こることに着目し、抗 8-oxo-dG 抗体による免疫組織化学を行ったところ、STAS 腫瘍細胞と最近傍の腫瘍原発巣辺縁部との間に染色強度に強い類似性が認められた。



これらの結果から我々は「原発巣辺縁部腫瘍細胞群に由来し、その性質を受け継いだ細胞塊が経気腔進展している。その結果、辺縁部腫瘍細胞間の細胞不均一性に起因する分子特性が STAS 腫瘍細胞群に反映され、STAS 腫瘍細胞間にも腫瘍内細胞不均一性が生じる」という仮説を立てた。

(4) STAS 陽性肺腺癌腫瘍組織における空間トランスクリプトーム解析

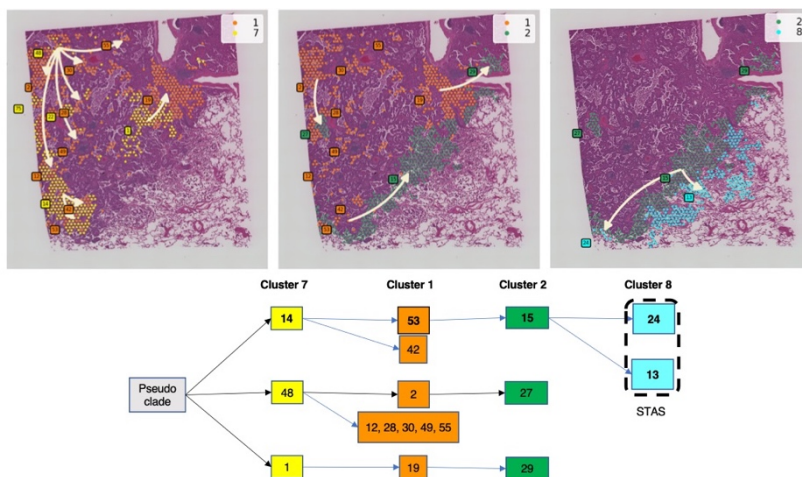
この仮説を検証するために、Visium Cytoassist を用いて取得した、STAS 陽性乳頭腺癌腫瘍組織 (FFPE 切片) の空間トランスクリプトーム データの解析を行った。本システムでは、切片上に配された 5~10 個の細胞に相当する spot と呼ばれる領域ごとに、それら細胞群の平均化されたトランスクリプトームデータが spot の座標位置情報と紐付けて取得される。また、通常のシングルセル RNA-seq と異なり、タンパク質をコードする mRNA のみが検出対象となる。spot の発現プロファイルに基づいて、切片上の全 spot に対してクラスター解析を行ったところ、9つのクラスターに分類された。この結果を UMAP で可視化したところ (下図)、HE 染色像から STAS



細胞塊のみを含む spot 92 個は独立したクラスターを形成せず、切片上の原発巣辺縁部腫瘍細胞群と共にクラスター 8 を構成していることが明らかとなった。しかしながら、主腫瘍や近接する非腫瘍との比較で STAS 腫瘍細胞を特徴づける遺伝子群も検出することができた (上ヒートマ

ップ)。この結果は、v8-10の発現や腫瘍細胞では酸化ストレスによりDNA損傷(8-oxo-dG化)状態のみならず、蛋白質をコードする遺伝子全体の活性化状態という観点からも、「原発巣辺縁部腫瘍細胞群からその性質を受け継いだ細胞塊が経気腔進展している」ことを強く示唆した。

そこで、空間トランスクリプトームデータのための細胞系譜解析パッケージ stLearn を用いた系譜解析を実施したところ下図に示すように、切片上(6mm x 6mm)の原発巣腫瘍本体内部から辺縁部を経て STAS 細胞塊に至る細胞系譜が検出された。各クラスター内の一部の細胞集団が系譜の軌道上に沿って配置されていた。各クラスター内の腫瘍 niche に存在する、ある状態にある腫瘍細胞群がその性質を変えながら移動し、STAS 細胞として経気腔進展すると考えられた。更に、Monocle3 を用いた STAS 腫瘍細胞群の軌道解析から、1本の弧を描くような軌道



上に配置されることがわかった。GSVA を用いた上皮性-間葉性状態の度合いを個別に評価した結果と合わせると、STAS は EMT を起こし辺縁部から進展すると短時間のうちに MET を気腔内で起こし再び上皮性状態に戻るというモデルが想定された。そしてその際、少なくとも

2つの異なる細胞状態へと移行することを見出した。これは、辺縁部腫瘍細胞間の細胞不均一性に起因する以外の腫瘍内細胞不均一性が、STAS 腫瘍細胞間に生じていることを示唆した。免疫組織化学の結果から想定した仮説は空間トランスクリプトーム解析の結果からも妥当なものと考えられる。

(5) 今後の課題と展開

STAS を有する肺腺癌の分子基盤解明の端緒となる本研究によって初めて、STAS 腫瘍細胞の細胞系譜とその腫瘍細胞間不均一性の存在が示された。

現在、STAS 腫瘍細胞を特徴づける分子群やその細胞系譜の詳細な解析を以下の3つの観点から進めている：① 細胞系譜を取り囲む niche な領域の細胞群がどのような性質・特徴を持っているのか、② それらは細胞系譜の軌道に沿ってどのように変化していくのか、③ niche な領域における STAS 腫瘍細胞に分化する細胞と周囲の相互作用はどのような分子に基づいているのか。

本研究では、STAS を特徴づける遺伝子群を見出したが、こうした解析を通じて見出される分子群は病理診断に有用であると考えられる。詳細を割愛したが、本研究では STAS 陰性乳頭腺癌腫瘍組織の空間トランスクリプトーム データも取得しており、STAS 陽性主腫瘍組織と統合したクラスター解析の結果、同一のクラスターを形成しないことが判明した。上記①～③の解析を通じて同定される niche な腫瘍内微小環境を特徴づける分子群は、STAS 病理診断時の偽陰性回避する有用な分子マーカーとなることが期待される。

<引用文献>

- ① Hisashi Saji et.al., Segmentectomy versus lobectomy in small-sized peripheral non-small-cell lung cancer (JCOG0802/WJOG4607L): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled, non-inferiority trial, *Lancet*, **399**, 2022, 1607-1617
- ② Jialong Li et.al., Meta-analysis of Lobectomy and Sublobar Resection for Stage I Non-small Cell Lung Cancer With Spread Through Air Spaces, *Clin Lung Cancer*, **23**, 2022, 208-213
- ③ Hänzelmann S et.al., GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data, *BMC Bioinform*, **14**, 2013, doi: 10.1186/1471-2105-14-7.
- ④ Tan TZ et.al., Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients., *EMBO Mol Med*, **6**, 2014, 1279-3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢追毅
2. 発表標題 非小細胞肺癌における新規腫瘍転移様式の分子病理学的解析
3. 学会等名 第7回 北陸エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内堀篤樹、矢追毅、丹藤創、井上匡美、伊東恭子
2. 発表標題 非小細胞肺癌における新規腫瘍転移様式STASの分子病理学的解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 匡美 (Inoue Masayoshi) (10379232)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	丹藤 創 (Tando So) (80423870)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------